

# PENENTUAN KINETIKA URIKASE DARI SEL *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, DAN *B. cereus*

(Uricase Kinetic Determination in *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*,  
and *B. cereus* Cells)

Dyah Iswantini<sup>1\*)</sup>, Novik Nurhidayat<sup>2)</sup>, Trivadila<sup>1)</sup>, Andayani Nurjayati<sup>1)</sup>

## ABSTRACT

Uric acid concentration could be determined based on the oxidation of uric acid into allantoin in the presence of uricase. Determination of uric acid concentration is needed to diagnose the occurrence of kidney disease in gout patients. The aim of the research was to study the kinetics of uricase in *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, and *B. cereus* cells using spectrophotometry method by measurement the decrease of uric acid absorbance at 293 nm. The optimum conditions of uricase activity from the three bacterial cells occurred in physiological conditions and uricase activity was stable until the second day. The values of maximum velocity ( $V_{max}$ ) for *B. subtilis*, *B. megaterium*, and *B. cereus* were 0.1642, 0.0824, and 0.0412 mM/min, respectively. The values of Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ) for *B. subtilis*, *B. megaterium* and *B. cereus* were 0.0003, 0.0036, and 0.0036 mM, respectively. The value of catalytic constant ( $k_{kat}$ ) for *B. subtilis*, *B. megaterium*, and *B. cereus* were 410.5000, 171.6667, and 257.5000 mM/min mL OD=1, respectively. Based on these results, among all bacteria tested, the highest of uricase binding with substrate in *B. subtilis* cells was observed because of the smallest of  $K_m$  value and greatest of  $V_{max}$  and  $k_{kat}$ .

**Keywords:** Kinetics, uricase, spectrophotometry, *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *B. cereus* cells.

## ABSTRAK

Penentuan kadar asam urat dilakukan berdasarkan pada oksidasi asam urat menjadi allantoin dengan adanya urikase. Penentuan tersebut diperlukan untuk mendiagnosa terjadinya gagal ginjal pada penderita asam urat. Penelitian ini menggunakan urikase yang berasal dari sel bakteri *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, dan *B. cereus* untuk dipelajari kinetikanya dengan menggunakan metode spektrofotometri, yaitu mengukur penurunan serapan asam urat pada panjang gelombang 293 nm. Kondisi optimum urikase yang dihasilkan dari ketiga sel bakteri tersebut terjadi pada kondisi fisiologis dan aktivitas urikase stabil hingga hari kedua. Nilai kecepatan maksimum ( $V_{maks}$ ) untuk *B. subtilis*, *B. megaterium*, dan *B. cereus* adalah 0.1642, 0.0824, dan 0.0412 mM/menit secara berturut-turut. Nilai konstanta Michaelis-Menten ( $K_m$ ) untuk *B. subtilis*, *B. megaterium* dan *B. cereus* berturut-turut adalah 0.0003, 0.0036, dan 0.0036 mM. Nilai konstanta katalitik ( $k_{kat}$ ) untuk *B. subtilis*, *B. megaterium* dan *B. cereus* berturut-turut adalah 410.5000, 171.6667, dan 257.5000 mM/menit mL OD=1. Berdasarkan pada hasil ini dapat dinyatakan bahwa bakteri yang paling kuat mengikat substrat adalah *B. subtilis* dengan nilai  $K_m$  paling kecil,  $V_{maks}$  dan  $k_{kat}$  paling besar.

**Kata kunci:** Kinetika, urikase, spektrofotometri, sel *Bacillus subtilis*, *B. megaterium* dan *B. cereus*.

## PENDAHULUAN

Asam urat merupakan senyawa kristal yang memiliki kelarutan lebih kecil dari pada senyawa allantoin. Pemeriksaan kadar asam urat diperlukan untuk memonitor kondisi kesehatan penderita asam urat sebagai diagnosa terjadinya gagal ginjal.

Pemeriksaan asam urat biasa dilakukan di dalam laboratorium dengan teknik spektrofotometri, kolorimetri, dan elektrokimia (Lotfy, 2008). Pada umumnya pengukuran asam urat secara klinis dilakukan dengan metode spektrofotometri. Pengukuran menggunakan metode ini berdasarkan pada oksidasi asam urat menjadi allantoin dengan adanya enzim urikase (Bergmeyer *et al.*, 1974).

Urikase merupakan suatu katalis biologi dalam reaksi oksidasi asam urat. Urikase telah ditemukan pada mikroba, jamur, dan tumbuhan tingkat tinggi. Beberapa mikroba dapat menghasilkan urikase

<sup>1)</sup> Dep. Kimia, Fakultas Matematika dan IPA, Institut Pertanian Bogor.

<sup>2)</sup> Divisi Mikrobiologi R & D Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Bogor.

\*) Penulis Korespondensi: dyahprado@yahoo.co.id

diantaranya *Bacillus. fastidiosus* (Bongaerst *et al.*, 1978) *B. subtilis*. TB-90 (Huang dan Wu, 2004) *B. thermocatenulatus* (Lotfy, 2008), *Pseudomonas aeruginosa* (Fattah *et al.*, 2005).

Penggunaan urikase dalam pengukuran asam urat memiliki kelemahan karena tidak stabilnya enzim dan biayanya yang mahal. Oleh karena itu, untuk mengatasi hal tersebut digunakanlah mikrob penghasil urikase sebagai pengganti enzim murni. Penggunaan mikrob memiliki kelebihan yaitu lebih murah, lebih toleran terhadap pH, dan mudah diperoleh. Beberapa mikrob dari *Bacillus* telah menghasilkan aktivitas urikase di antaranya *B. subtilis*. TB-90 sebesar 11,4 Unit/mL dan *B. thermocatenulatus* sebesar 1,25 Unit/mL. Oleh karena itu, dilakukan pengembangan untuk mendapatkan jenis mikrob lain dari *Bacillus*. Mikrob yang digunakan pada penelitian ini adalah *B. subtilis*, *B. megaterium*, dan *B. cereus* yang belum diketahui aktivitas enzim urikase. Mikrob tersebut dipilih karena mudah diperoleh, diperbanyak dan menghasilkan amonia, sehingga diharapkan mampu menghasilkan aktivitas urikase lebih besar (Hall dan Macvicar, 1954).

Asam urat dapat digunakan sebagai substrat dalam penentuan kinetika enzim. Awalnya penentuan kinetika enzim dilakukan menggunakan persamaan Michaelis-Menten, dengan parameter yang ditentukan antara lain  $V_{maks}$ ,  $K_m$ , dan  $k_{kat}$ . Akan tetapi, penempatan data dengan persamaan ini memiliki kelemahan, yaitu nilai  $V_{maks}$  yang didapat kurang tepat (Lehninger *et al.*, 2004). Pada umumnya nilai  $V_{maks}$  dan  $K_m$  dihitung melalui persamaan Lineweaver-Burk. Hal ini dikarenakan persamaan Lineweaver-Burk memiliki kelebihan, yaitu variabel  $v$  dan  $[S]$  berada pada sumbu yang berbeda. Kinetika urikase dilakukan dengan memetakan variabel  $v$  yaitu aktivitas enzim urikase dan  $[S]$  yaitu konsentrasi substrat asam urat.

Penelitian ini bertujuan menentukan kinetika urikase dari beberapa mikrob Indonesia yang berfungsi dalam pengukuran asam urat menggunakan metode spektrofotometri, serta mempelajari kestabilannya. Selanjutnya penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat untuk aplikasi biosensor asam urat menggunakan metode elektrokimia.

## BAHAN DAN METODE

Bahan-bahan yang digunakan adalah enzim urikase (EC 1.7.3.3 dari *Arthrobacter globiformis* Sigma-Aldrich), sel *B. subtilis*, *B. megaterium*, dan

*B. cereus* (ketiga sel tersebut merupakan koleksi laboratorium Genetik Mikrobiologi, Puslit Biologi, LIPI), asam urat, bufer borat, dan media heterotrof.

### Pembuatan media heterotrof

**Media heterotrof padat.** Bahan media heterotrof padat dimasukan ke dalam labu Erlenmeyer dan dipanaskan hingga homogen dan mencair. Kemudian labu Erlenmeyer ditutup dengan sumbat dan disterilisasi menggunakan autoklaf selama kurang lebih 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 15 psi. Labu Erlenmeyer dikeluarkan dari autoklaf setelah itu dituang ke dalam cawan petri hingga media dingin dan memadat. Media digunakan untuk meremajakan sel.

**Media heterotrof cair.** Kandungan media heterotrof cair sama dengan heterotrof padat dengan penambahan glukosa 0,125 g, tanpa pemberian agar. Selanjutnya, proses sterilisasi tidak berbeda dengan sterilisasi heterotrof padat.

### Uji aktivitas urikase secara kualitatif

Bakteri ditanam pada media heterotrof padat yang ditambahkan asam urat 0,2% (asam urat tidak larut). Lalu campuran tersebut diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam, 48 jam, dan 72 jam. Setelah itu, dilihat hasil pertumbuhannya berupa zona bening (positif urikase), bakteri terpilih dilihat aktivitasnya melalui besarnya zona bening.

### Pertumbuhan dan pemanenan bakteri

Bakteri ditumbuhkan pada sebuah media padat yang mengandung asam urat 0,1 mM. diinkubasi selama 2 hari pada suhu 37°C. Bakteri yang tumbuh selanjutnya ditanam pada 50 mL media cair yang berisi asam urat 0,1 mM dan diinkubasi pada 37°C selama 1 hari sampai  $OD_{600} = 1$ . Sel bakteri dipanen dengan sentrifuse pada kecepatan 10.000 rpm ( $8000 \times g$ ) selama 10 menit. Pelet dipisahkan dari supernatan, dicuci dua kali dengan bufer fosfat pH 7 dan diresuspensikan dengan NaCl 85%.

### Pengukuran aktivitas urikase secara spektrofotometri (Bergmeyer *et al.*, 1974)

Sebanyak 0,02 mL suspensi bakteri ( $OD=1$ ) ditambahkan ke dalam 3,09 mL bufer borat pH 8 dan 0,01 mL asam urat 3,57 mM, kemudian diinkubasi selama 5 menit. Selanjutnya nilai serapan diukur pada panjang gelombang 293 nm dengan satuan aktivitas urikase yaitu Unit/mL.

$$\text{Aktivitas urikase} = \frac{A_{\text{terkoreksi}} \times 3,12}{12,6 \times 0,02 \times t}$$

Keterangan:

3,12 = volume total dalam pengukuran (mL)

12,6 = koefisien ekstingsi asam urat pada  $\lambda_{293\text{nm}}$  ( $\text{Cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ )

0,02 = volume enzim yang digunakan (mL)

$t$  = waktu inkubasi (5 menit)

### Pengaruh pH, suhu, konsentrasi dan stabilitas terhadap aktivitas urikase

Pengukuran nilai pH bufer dilakukan pada ragam nilai pH bufer 6, 7, 8, 9, dan 10. Pengukuran nilai suhu dilakukan pada ragam nilai suhu 15, 25, 35, 45, dan 55°C. Pengukuran konsentrasi substrat dilakukan dengan mengamati penurunan konsentrasi asam urat pada ragam konsentrasi 0,011–0,16 mM dalam bufer borat pH optimum dan temperatur kamar (25°C). Pengukuran nilai stabilitas bakteri dilakukan dengan cara menyimpan bakteri pada suhu 4°C selama 1, 2, dan 7 hari.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

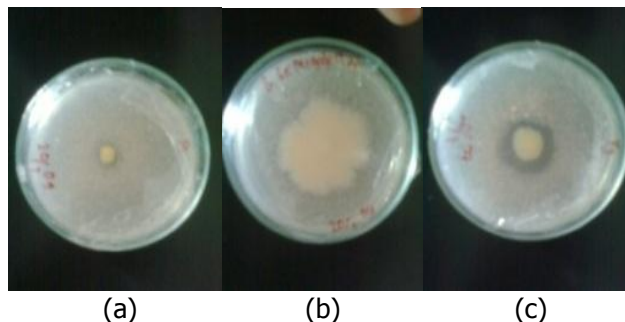
### Uji aktivitas urikase secara kualitatif

Sel *B. subtilis*, *B. megaterium*, dan *B. cereus* ditumbuhkan pada media heterotrof. Bakteri tersebut memiliki ciri berbentuk batang, merupakan bakteri gram positif karena mengikat warna ungu kebiruan dari kristal violet, dan bersifat katalase positif jika ditetesi  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Penentuan aktivitas urikase yang dihasilkan oleh bakteri dapat dilakukan secara kualitatif yang berguna untuk melihat aktivitas urikase terbesar dalam sel bakteri secara kasar dan cepat. Penentuan sel bakteri secara kualitatif dilakukan dengan mengamati zona bening pada media padat yang telah ditambahkan asam urat 0,2% seperti terlihat pada Gambar 1.

Zona bening menunjukkan bahwa asam urat telah didegradasi oleh enzim urikase ekstraseluler yang dihasilkan oleh bakteri (Azab *et al.*, 2005). Zona bening yang dihasilkan sel bakteri memperlihatkan ukuran yang berbeda-beda (Tabel 1). Zona bening belum muncul pada hari pertama karena bakteri sedang mengalami fase pertumbuhan sehingga sintesis eksoenzim terhambat. Pada hari kedua, zona bening terbesar ditujukan oleh *B. subtilis* sebesar 2,5 cm, *B. cereus* sebesar 0,5 cm sementara pada *B. megaterium* belum terlihat zona bening hal ini dikarenakan bakteri sedang dalam fase pertumbuhan sehingga biosintesis eksoenzim meningkat (Priest

1988). Dari hasil tersebut diharapkan *B. subtilis* memiliki aktivitas urikase lebih besar dari dua bakteri lainnya.



Gambar 1. Zona bening (a) *B. subtilis*, (b) *B. megaterium*, dan (c) *B. cereus*.

Tabel 1. Pengamatan zona bening pada berbagai isolat bakteri.

Bakteri	Hari 1	Hari 2	Hari 3
<i>B. subtilis</i>	+	+++	++++
<i>B. megaterium</i>	-	+	++
<i>B. cereus</i>	+	++	++++

Keterangan :

- = belum terlihat zona bening
- + = zona bening sudah agak terlihat
- ++ = zona bening terlihat 0,5 cm
- +++ = zona bening terlihat 2,5 cm
- ++++ = zona bening terlihat > 2,5 cm

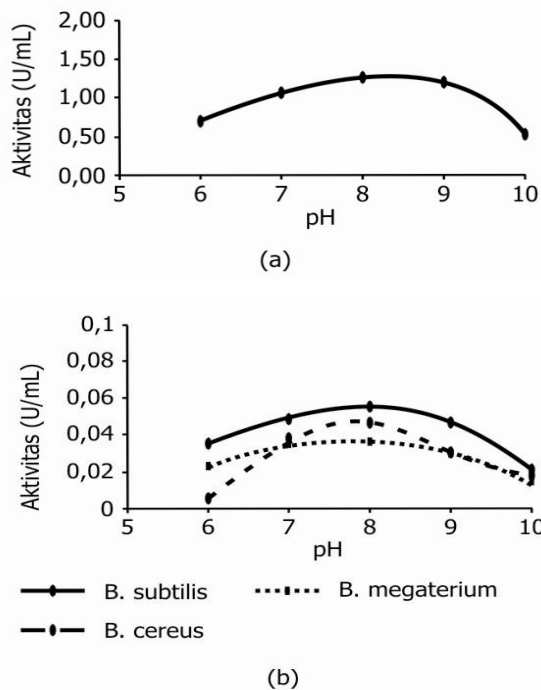
### Uji aktivitas urikase murni secara kuantitatif

Penentuan aktivitas urikase murni dilakukan pada pH 8,5 suhu 25°C sebesar 1,2282 Unit/mL. Pengukuran aktivitas dilakukan berdasarkan penurunan konsentrasi asam urat pada panjang gelombang 293 nm, yang merupakan oksidasi asam urat membentuk allantoin. Allantoin yang terbentuk tidak menyerap pada panjang gelombang 293 nm sehingga penurunan serapan pada panjang gelombang 293 nm sebanding dengan keberadaan konsentrasi asam urat (Trivedi *et al.*, 1978). Aktivitas tertinggi ditunjukkan oleh *B. subtilis* sebesar 0,0570 Unit/mL kultur, sementara aktivitas terkecil dimiliki oleh *B. megaterium*, yaitu sebesar 0,0322 Unit/mL kultur. Perbedaan aktivitas pada bakteri disebabkan adanya perbedaan jenis bakteri.

### Pengaruh pH terhadap aktivitas urikase

Setiap enzim mempunyai pH optimum yang berbeda. Disekitar pH optimum enzim mempunyai

kestabilan yang tinggi dan hanya aktif pada kisaran pH tertentu. Pada penelitian ini kisaran pH bufer diatur pada rentang 6–10. Pengukuran dilakukan pada konsentrasi asam urat tetap, yaitu 3,57 mM. Respon maksimum diperoleh urikase murni pada pH 8 (Gambar 2a) sebesar 1,2455 Unit/mL. Hal ini terjadi karena gugus penerima proton pada tapak aktif enzim berada dalam tingkat ionisasi yang diinginkan. Penelitian ini sesuai dengan penelitian Arslan, (2008) dengan menggunakan metode amperometri, yakni optimum pada pH 8.



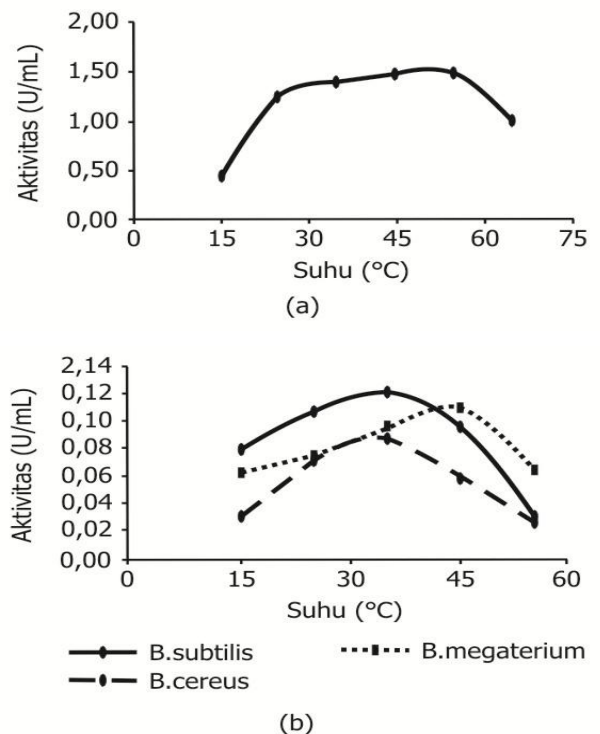
Gambar 2. Hubungan aktivitas urikase (a) enzim murni dan (b) tiga jenis *Bacillus* pada pH bufer borat.

Aktivitas urikase diperlihatkan *B. subtilis*, *B. megaterium*, dan *B. cereus* secara berturut-turut sebesar 0,1106; 0,0702; dan 0,0858 Unit/mL kultur, dengan respon maksimum terjadi pada pH 8 (Gambar 2b). Bomalaski *et al.*, (2002) mengemukakan bahwa respon maksimum pada berbagai jenis bakteri (*C. utilis*, *Arthrobacter protoformiae*, *Aspergillus flavus*) terjadi pada pH 8,5 dan 9 perbedaan ini terjadi karena adanya perbedaan jenis bakteri dan media pertubuhan.

#### Pengaruh suhu terhadap aktivitas urikase

Suhu merupakan parameter yang memberikan efek pada aktivitas enzim dan biasa digunakan untuk

mengetahui ketergantungan respon enzim. Pengaruh suhu diamati dengan ragam suhu 15–65°C pada pH 8 menggunakan konsentrasi asam urat sebesar 3,57 mM. Enzim murni mencapai suhu optimum pada 55°C dengan aktivitas sebesar 1,4907 Unit/mL, diatas suhu tersebut aktivitas mengalami penurunan (Gambar 3a). Kenaikan suhu dapat meningkatkan kecepatan reaksi pada kisaran tertentu. Penggunaan suhu yang terlalu tinggi dapat menurunkan fungsi kerja enzim dan dapat mempengaruhi konformasi substrat sehingga substrat mengalami hambatan dalam memasuki tapak aktif enzim. Suhu juga mempengaruhi aktivitas urikase yang dihasilkan sel bakteri yang tumbuh pada keadaan mesofilik dengan variasi suhu 10–50°C (Gambar 3b). Suhu 35°C memperlihatkan suhu optimum pada *B. subtilis* dan *B. cereus* berturut-turut 0,1205 dan 0,0867 Unit/mL kultur. Sementara aktivitas optimum *B. megaterium* terjadi pada suhu 45°C sebesar 0,1090 Unit/mL kultur.

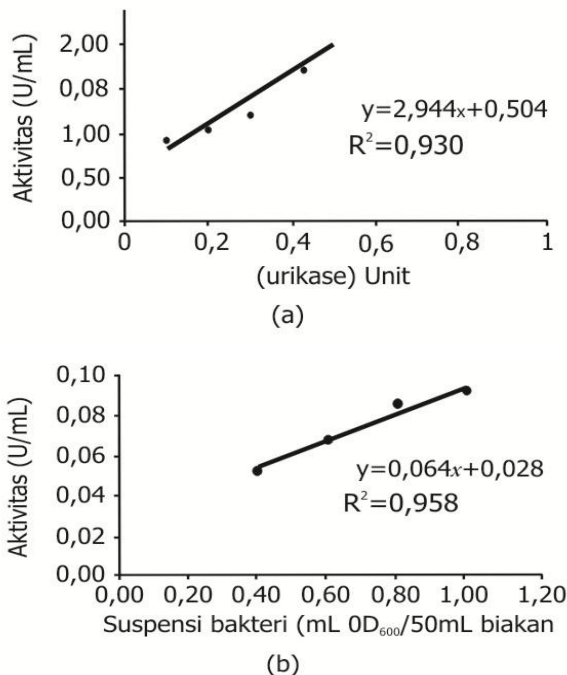


Gambar 3. Hubungan aktivitas urikase (a) enzim murni dan (b) tiga jenis *Bacillus* pada suhu.

#### Pengaruh konsentrasi urikase terhadap aktivitas urikase

Penggunaan enzim berlebih menyebabkan tidak semua enzim berikatan dengan substrat

sehingga kecepatan maksimum tidak tercapai dan reaksi menjadi tidak efisien. Gambar 4 menunjukkan perubahan konsentrasi enzim berkorelasi terhadap aktivitas urikase. Aktivitas urikase meningkat dengan bertambahnya konsentrasi enzim. Laju reaksi optimum enzim murni memperlihatkan kenaikan aktivitas sampai konsentrasi enzim 0,5 Unit sebesar 2,110 Unit/mL, sementara laju reaksi optimum pada *B. subtilis*, *B. megaterium*, dan *B. cereus* terjadi pada suspensi bakteri 1 mL OD<sub>600</sub>/50 mL biakan secara berturut-turut sebesar 0,0891; 0,0768; dan 0,0792 Unit/ mL kultur.

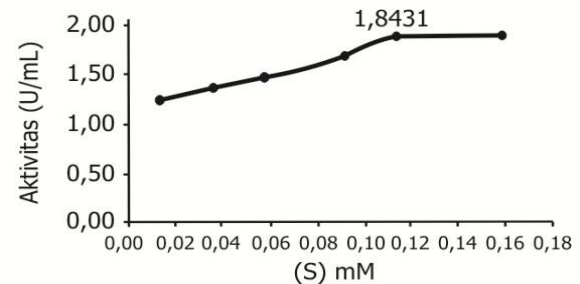


Gambar 4. Hubungan aktivitas urikase (a) enzim murni dan (b) *B. subtilis* pada konsentrasi enzim.

### Pengaruh konsentrasi substrat asam urat terhadap aktivitas urikase

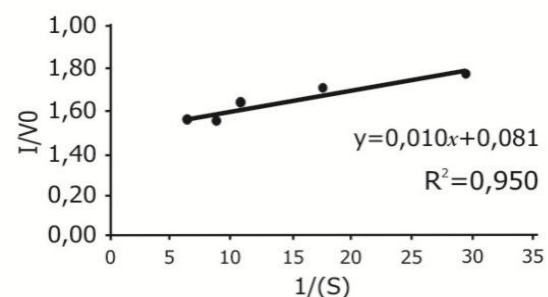
Peningkatan konsentrasi substrat memengaruhi kecepatan enzim dalam mengkatalisis reaksi. Konsentrasi substrat asam urat pada pengukuran enzim murni diragamkan antara 0,011–0,160 mM. Gambar 5 memperlihatkan substrat mencapai keadaan stabil pada konsentrasi 0,114 mM dengan nilai aktivitas sebesar 1,8183 Unit/mL. Linearitas asam urat berkisar antara 0,011–0,114 mM. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa metode ini dapat digunakan untuk mengukur asam urat sampai konsentrasi 0,114 mM. Korelasi aktivitas urikase

terhadap konsentrasi substrat asam urat diperlihatkan pada Gambar 5. Bentuk kurva tersebut menunjukkan aktivitas urikase menurut persamaan Michaelis-Menten. Akan tetapi, nilai  $K_m$  dan  $V_{max}$  sulit ditentukan dengan tepat dari kurva Michaelis-Menten. Oleh karena itu, diperlukan cara lain untuk memperoleh nilai  $K_m$  dan  $V_{max}$  yang lebih tepat.



Gambar 5. Hubungan aktivitas urikase enzim murni pada konsentrasi substrat.

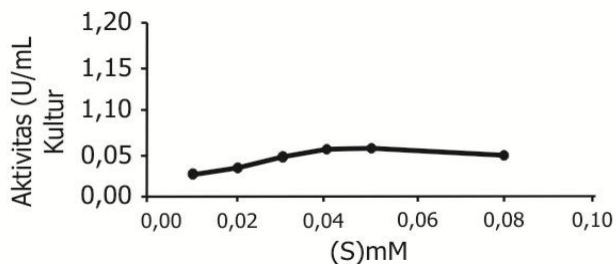
Nilai  $K_m$  dan  $V_{maks}$  urikase ditentukan dengan metode Lineweaver-Burk (Gambar 6). Melalui ekstrapolasi persamaan regresi linear, diperoleh nilai  $K_m$  urikase sebesar 0,0208 mM dan  $V_{maks}$  sebesar 2,0790 Unit/mL. Hal ini berarti untuk mencapai setengah dari kecepatan maksimum dibutuhkan substrat dengan konsentrasi 0,0208 mM sehingga konsentrasi asam urat sebesar 0,0416 mM sudah cukup dijadikan dasar untuk optimasi selanjutnya. Semakin rendah nilai  $K_m$  semakin kuat ikatan antara enzim dan substrat. Pada saat  $V_{maks}$  seluruh enzim akan terikat dengan substrat dan enzim tersebut sudah jenuh terhadap substrat (Lehninger *et al.*, 2004). Parameter lain dalam penentuan kinetika adalah  $k_{kat}$ . Terbentuknya  $k_{kat}$  dari kompleks enzim-substrat menjadi produk lebih menggambarkan efisiensi katalitik jumlah maksimum molekul substrat yang dikonversi menjadi allantoin. Nilai  $k_{kat}$  pada enzim murni sebesar 957,1820 menit<sup>-1</sup>.



Gambar 6. Kurva Lineweaver-Burk enzim murni.



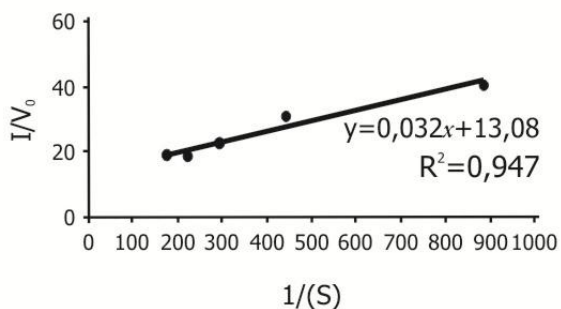
Konsentrasi substrat pada pengukuran menggunakan sel bakteri diragamkan antara 0,0011–0,0091 mM dan memperlihatkan hasil linear pada konsentrasi 0,0011–0,0056 mM. Deteksi asam urat dapat dilakukan sampai konsentrasi 0,0056 mM (Gambar 7) dengan aktivitas yang ditunjukkan *B. subtilis*, *B. megaterium* dan *B. cereus*, secara berturut-turut sebesar 0,0545; 0,0495; dan 0,0248 Unit/mL kultur.



Gambar 7. Hubungan aktivitas urikase *B. subtilis* pada konsentrasi substrat.

Tabel 2. Data nilai  $V_{maks}$ ,  $K_m$  dan  $k_{kat}$ .

Keterangan	$V_{maks}$ mM/menit	$K_m$ mM	$k_{kat}$ mM/ menit mL OD=1
<i>B. subtilis</i>	0,1642	0,0003	410,5000
<i>B. cereus</i>	0,0412	0,0036	171,6667
<i>B. megaterium</i>	0,0824	0,0036	257,5000



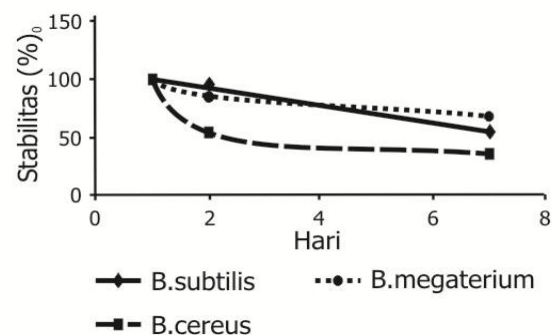
Gambar 8. Kurva Lineweaver-Burk *B. Subtilis*.

Tabel 2 menunjukkan parameter kinetika untuk sel *B. subtilis*, *B. megaterium* dan *B. cereus*. Nilai  $K_m$  pada sel *B. subtilis* paling kecil dari pada bakteri lainnya sebesar 0,0003 mM sehingga ikatan enzim substrat lebih kuat. Nilai  $V_{maks}$  terbesar diperoleh *B. subtilis* adalah 0,1642 mM/menit sehingga kecepatan reaksinya lebih besar dari bakteri lainnya (Gambar 8). Efisiensi katalitik terbesar ditunjukkan oleh *B. subtilis*, yaitu sebesar 410,5000 mM/Menit mL

OD<sub>600</sub>.  $k_{kat}$  lebih memperlihatkan efisiensi katalitik dalam mengkatalisis reaksi enzimatis asam urat menjadi allantoin.

### Stabilitas urikase pada penyimpanan 4°C.

Enzim urikase yang telah dilarutkan dalam buffer pH 8,5 disimpan pada -20 °C akan bertahan kurang dari 1 tahun (Zang *et al.*, 2007). Pada penelitian ini dilakukan penyimpanan urikase murni pada suhu 4°C dalam bufer pH 8,5. Data pengukuran kestabilan dapat dilihat pada Gambar 9. Stabilitas hari kedua mencapai 94,28% dan hari ketujuh mencapai 74,80%. Adanya penurunan kestabilan yang cukup besar terjadi akibat enzim telah rusak. Bakteri tidak aktif pada suhu 4°C, sehingga bakteri diharapkan memberikan kestabilan yang baik pada penyimpanan 4 °C. Aktivitas urikase masih stabil pada hari kedua yakni sebesar 93,61% untuk sel *B. subtilis* dan 85,36% untuk sel *B. cereus*, sementara penurunan besar terjadi pada *B. megaterium*, yakni sebesar 53,19%. Hari ketujuh, kestabilan urikase yang dihasilkan sel *B. megaterium* menurun hingga 35,10%, sementara pada sel *B. subtilis* dan *B. cereus* urikase masih stabil sekitar 54–67%. Penurunan aktivitas enzim selama tujuh hari penyimpanan dikarenakan bakteri telah mengalami kematian akibat rusaknya ikatan protein.



Gambar 9. Kestabilan aktivitas urikase tiga jenis *Bacillus* pada waktu.

## KESIMPULAN

Pertumbuhan *B. subtilis*, *B. megaterium* dan *B. cereus* memiliki pH dan suhu optimum pada pH 8 dan 35-45 °C. Metode spektrofotometri, dapat digunakan dalam mengukur asam urat secara *in vivo* sampai konsentrasi 0,1144 mM untuk enzim murni dan 0,0056 mM untuk ketiga sel bakteri. Nilai  $V_{maks}$ ,  $K_m$  dan  $k_{kat}$  untuk enzim murni sebesar 2,0838 U/mL

enzim; 0,0283 mM; dan 957,1820 menit<sup>-1</sup>. Sementara *B. subtilis* memiliki afinitas terbesar di antara ketiga sel dengan nilai  $V_{maks}$ ,  $K_m$ , dan  $k_{kat}$  sebesar 0,1642 mM/menit kultur; 0,0003 mM; dan 410,5000 mM/menit mL OD<sub>600</sub>, bakteri ini paling baik mengikat substrat. Afinitas terbesar kedua dimiliki *B. megaterium* dengan nilai  $V_{maks}$ ,  $K_m$ , dan  $k_{kat}$  sebesar 0,0824 mM/menit kultur; 0,0036 mM; dan 257,5000 mM/menit mL OD<sub>600</sub>. Dan afinitas terkecil ditunjukkan oleh *B. cereus* dengan nilai  $V_{maks}$ ,  $K_m$ , dan  $k_{kat}$  sebesar 0,0412 mM/menit kultur; 0,0036 mM; dan 171,6667 mM/menit mL OD<sub>600</sub>. Aktivitas urikase pada ketiga sel bakteri umumnya stabil sampai hari kedua.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Kami ucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional yang telah mendanai penelitian ini melalui program Hibah Kompetensi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Arslan F. 2008. An amperometric biosensor for uric acid determination prepared from uricase immobilized in polyaniline-polypyrrole. *Sensor* 8:5492-5500
- Azab E.A., Ali M.M., Farred M.F. 2005. Studies on uricase induction in certain bacteria. *Egyptian Journal of Biology* 7:44-54.
- Bergmeyer H.U., Gawehn K., Grassl M. 1974. In *Methods on Enzymatic Analysis* (Bergmeyer HU). Ed ke-2. Volume ke-1 (518). New York: Academic Pr.
- Bongaerst G.P.A., Uitzetter J., Brouns R. and Vogels G.D. 1978. Uricase of *Bacillus fastidiosus* properties and regulation of syntesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 527:348-358.
- Bomalaski *et al.*, 2002. Uricase with polyethylene glycol (uricase PEG 20): biochemical and preclinical studies. *J Rheumatol* 29:1942-1949.
- Fattah Y., Saeed H., Gohar M., El-Baz M. 2005. Improved production of *Pseudomonas aeruginosa* uricase by optimization of process parameters through statistical experimental designs. *Process Biochemistry* 40:1707-1714.
- Hall L.M., Macvicar R. 1954. Ammonia as an intermediate in nitrate redijction by *Bacillus subtilis*. *J. Bio Chem* 197:305-310
- Huang S.H., Wu T.K. 2004. Modified colorimetric assay for uricase activity and a screen for mutan *Bacillus subtilis* gene following StEP mutagenesis. *The Journal of Reumatol* 271:517-523.
- Lehninger A.L., Nelson D.L., Cox M.M. 2004. *The Princiles of Biochemistry*. Ed ke-4. New York: Worth Publisher
- Lotfy W. 2008. Production of a thermostable *uricase* by a novel *Bacillus thermocatenulatus* strain. *Bioresource Technology* 99:699-702.
- Priest F.G., Goodfellow M., Todd C. 1988. *Bacillus* heterogenety, *Journal of Genetics Microbiology* 134:1847-1882.
- Trivedi *et al.*, 1978. New Ultraviolet (340 nm) Method for assay of uric acid in serum or plasma. *Clinical Chemistry*, 24(4):562-566
- Zang Y *et al.*, 2007. Development and analytical application of an uric acid biosensor using an uricase-immobilized eggshell membrane. *Biosensor and Bioelectronic*. 22:1791-1797.